

ZELLULÄRE IMMUNPHÄNOMENE
BEI DER MANIFESTATION
DES TYP I DIABETES MELLITUS

Anette-Gabriele Ziegler

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0104

Aus der III. Medizinischen Abteilung des
Akademischen Lehrkrankenhauses München-Schwabing
(Chefarzt: Prof. Dr. H. Mehnert)

ZELLULÄRE IMMUNPHÄNOMENE BEI DER MANIFESTATION DES
TYP I DIABETES MELLITUS

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anette-Gabriele Ziegler

aus
München
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Standl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.1986

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	2
2.1. Probanden	2
2.1.1. Kontrollgruppe	2
2.1.2. Die Patienten	2
2.2. Methodik	3
2.2.1. Präparation von peripheren Blutlymphozyten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation	3
2.2.2. Lymphozytentypisierung mit monoclonalen Anti- körpern mittels indirekter Immunfluoreszenz	3
2.2.3. Prinzip der Doppelfluoreszenz und kompetitive Bindung	4
2.3. Antikörper	4
2.4. Statistik	6
3. <u>Ergebnisse</u>	7
3.1. Charakterisierung des HLA-DR-Antikörpers K 14 und der von ihm erkannten Determinante	7
3.2. Korrelation des Antikörpers K 14 mit dem Antikörper L243 bei Diabetikern und Normalpersonen	8
3.3. Doppelimmunfluoreszenz von peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit infektiöser Mononukleose	8
3.4. Leuko- und Lymphozytenzahlen bei Diabetikern	9
3.5. HLA-Typisierung bei insulinpflichtigen Diabetikern	10

3.6. T-Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit unterschiedlicher Diabetesdauer	10
3.7. B-Lymphozyten bei Diabetikern unter Berücksichtigung der Diabetesdauer und deren Korrelation zu K 14-bzw. L243-positiven Zellen	11
3.8. K 14- und L243-positive mononukleäre Zellen bei Diabetikern und Normalpersonen	11
3.9. Doppelimmunfluoreszenz von mononukleären Zellen bei Diabetikern mit den Antikörpern Leu 2, bzw. Leu 3 und K 14	12
3.10. Vergleich von Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit und ohne Inselzellantikörpern	12
4. <u>Diskussion</u>	
4.1. <u>Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus</u>	28
4.1.1. Hypothesen über den Vererbungsmodus	28
4.1.2. HLA und Diabetes mellitus	28
4.1.3. Zelluläre Autoimmunphänomene	29
4.1.4. Humorale Immunphänomene	31
4.1.5. Tierexperimente	32
4.2. Wissenschaftliche Grundlagen	33
4.3. Eigene Ergebnisse zur Spezifität des Antikörpers K14	34
4.4. Ia-Antigen positive mononukleärer Zellen	34
4.5. Doppelimmunofluoreszenz von mononukleären Zellen mit Anti-T-Lymphozyten und Anti-Ia-Antikörpern	37
4.6. T-Zell-Subpopulationen	39

4.7. Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit und ohne Inselzellantikörper	39
5. <u>Zusammenfassung</u>	41
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	43

1. Einleitung

Unter dem Begriff "Diabetes mellitus" faßt man ein Syndrom zusammen, daß durch chronische Hyperglykämie, Insulinmangel und Störungen im Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel charakterisiert ist (Schöffling)(50).

Ätiologische und pathogenetische Forschungen der letzten Jahre bestätigten die Vermutung, daß es sich bei dem insulinpflichtigen (Typ-I) Diabetes nicht um eine akute plötzlich auftretende Erkrankung des Pankreas handelt, sondern um einen über mehrere Jahre andauernden autoimmunologischen Entzündungs- und Zerstörungsprozeß der insulinsezernierenden β -Zellen (12).

Die Forschungsergebnisse über die Immunpathogenese des Typ-I-Diabetes setzen sich heute im wesentlichen zusammen aus dem Nachweis von Inselzellantikörper ICA (33) und Inselzelloberflächenantikörper ICSA (46), aus einer gefundenen Assoziation der Krankheit mit bestimmten Histokompatibilitätsantigenen HLA (62,43), aus den Nachweis von Lymphozyteninfiltrationen in den Inselzellen (31,5,14) und aus Veränderungen der zellulären Immunantwort.

Die hier vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung zellulärer Immunphänomene zum Zeitpunkt der Manifestation eines insulinpflichtigen Diabetes leisten.

Dazu wurden immunkompetente periphere Blutlymphozyten mit Hilfe von monoclonalen Anti-Lymphozyten- und Anti-HLA DR-Antikörpern untersucht und mögliche Zusammenhänge zwischen Veränderungen der zellulären Abwehr und der Diabetesdauer, dem Vorhandensein von humoralen Immunphänomenen und der Assoziation mit bestimmten HLA-Antigenen analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Probanden

2.1.1. Die Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe befanden sich 10 stoffwechselgesunde Erwachsene im Alter zwischen 18 und 40 Jahren (durchschnittliches Alter $28,4 \pm 9,55$), davon 7 Frauen, 3 Männer, ohne Familienanamnese eines Typ-I- oder Typ-II-Diabetes.

2.1.2. Die Patienten

In dieser Gruppe befanden sich 20 Typ-I-Diabetiker im Alter von 12 bis 40 Jahren (durchschnittliches Alter $22,65 \pm 7,51$), davon 8 Frauen und 12 Männer. Bei 16 Patienten erfolgte die Diagnose jeweils zum Zeitpunkt einer akuten Stoffwechseldekompensation bei typischen Symptomen wie Polyurie, Polydypsie, Gewichtsabnahme und allgemeine Abgeschlagenheit.

Dabei wurde bei 10 Patienten die Untersuchung der Lymphozyten innerhalb der ersten Woche, bei 6 Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen vorgenommen. Bei 4 Patienten entwickelte sich ein absoluter Insulinmangel relativ langsam, so daß vom Zeitpunkt der Diagnose einer postprandialen Hyperglykämie bis zu einer akuten Stoffwechseldekompensation und auch bis zum Zeitpunkt der Untersuchung maximal 8 Monate vergingen. Bis dahin war eine Behandlung mit Diät und/oder Sulfonylharnstoffen erfolgt. Bei den Patienten mit einer Diabetesdauer unter 7 Tagen (Tabelle 3) betrugen zum Zeitpunkt der Untersuchung die mittlere Insulindosis 35 ± 3 IE (SEM), der mittlere Blutzucker 196 ± 7 mg% (SEM) und das mittlere Idealgewicht 96 ± 4 % (SEM). Bei den Patienten mit einer längeren Diabetesdauer betrugen die mittlere Insulindosis 22 ± 5 IE (SEM),

der mittlere Blutzucker 172 ± 5 mg% (SEM) und das mittlere Idealgewicht 101 ± 3 % (SEM).

Zusätzlich zu diesen zwei Kollektiven wurde ein 22-jähriger Patient mit einem pathologischen oralen Glukosebelastungstest und gelegentlich erhöhten postprandialen Blutzuckerwerten untersucht.

2.2. Methodik

2.2.1. Präparation von peripheren Blutlymphozyten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

Durch Punktion einer Armvene wurden 20 ml Blut mit einer heparinisierten Spritze (0,1 ml Heparin auf 20 ml Blut) entnommen. Dieses wurde mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7.2) im Verhältnis 1 : 2 verdünnt, in 25 ml Glasröhrchen auf je 8 ml Ficoll (Lymphozyten-präparierendes Medium, Dichte 1,077 g/ml) geschichtet und 40 Minuten bei 400 g und 20°C zentrifugiert (6). Danach wurde die Interphase, in der sich die Lymphozyten befanden, abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zellkammer gezählt und durch Verdünnung mit PBS auf die gewünschte Zellzahl 1×10^7 /ml eingestellt.

2.2.2. Prinzip der Lymphozytentypisierung mit monoclonalen Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die mononukleären Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit verschiedenen Antikörpern (siehe 5.3) gegen B-, T-Lymphozyten und T-Zell-Subpopulationen inkubiert. Dazu gab man in je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 100 µl zusammen mit 10 - 20 µl des fertigen Antikörpers. Nach der Inku-

bation auf Eis von 45 Minuten und einer anschließenden Waschung mit PBS bei 400 g 10 Minuten wurde der zweite fluoreszenzkonjugierte Antikörper auf die Zellen gegeben. Der Ansatz wurde vor Licht geschützt. Die Zellen wurden erneut 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann nach zweimaliger Waschung etwa 5 µl jeder Probe auf einen Objektträger aufgetragen. Dort wurden sie mit einem Deckglas und Nagellack vor Austrocknung geschützt. Jeweils 200 der Zellen konnten nun im Fluoreszenzmikroskop mit Fluoreszenzauflichtkondensor V FL mit verschiedenen Filtern für Grün- (Filtersatz 09) und Rot-Fluoreszenz (Filtersatz 15) betrachtet und ausgezählt werden. Die Resultate wurden als Prozentsatz von positiv markierten Zellen pro 100 mononukleärer Zellen ausgedrückt.

2.2.3. Prinzip der Doppelfluoreszenz und kompetitive Bindung

Hierfür wurden die Zellen zunächst 45 Minuten mit dem ersten IGG-Antikörper, dann nach zweimaligem Waschen mit PBS 45 Minuten mit dem zweiten IGM-Antikörper auf Eis inkubiert. Darauf wurde die Bindung dieser beiden monoclonalen Antikörper mit den Isotypenspezifischen sekundären Antikörper FITC und TRITC (siehe 5.3) nachgewiesen, die als Gemisch zugegeben wurden. Im mikroskopischen Vergleich eines Gesichtsfelds in Grün- und Rot-Fluoreszenz konnten doppelmarkierte Zellen ausgezählt werden.

2.3. Antikörper

Eingesetzt wurden die Antikörper Leu 2 (Suppressor und zytotoxische T-Lymphozyten), Leu 3 a + b (Helfer-T-Lymphozyten), Leu 4 (Pan-T-Lymphozyten), Leu 12 (B-Lymphozyten) und α-HLA DR der Fa. Becton Dickinson. Es handelt sich bei allen um Maus-Antikörper

der IGG-1-Klasse, die aus der Fusion von Myelom- und Milzzellen von mit humanen T-Lymphozyten immunisierten Mäusen gewonnen wurden (nach Köhler-Milstein) (29). α -HLA DR ist ein Antikörper der IGG 2a-Klasse aus dem Zellclon L 243 aus der Fusion mit einer humanen B-Zell-Leukämie. Es ist ein Antikörper, der mit einer monomorphen Determinante des DR-Moleküls reagiert. Genauer Ursprung und Spezifitäten dieser Antikörper sind aus Tabelle 8 zu entnehmen.

Der Antikörper K 14 (Labor Prof. Rieber) ist ein monoklonaler Antikörper der IGM-Klasse, entstanden aus der Fusion mit einer humanen chronisch myeloischen Leukämie. Seine Anti-DR-Spezifität wurde auf der B-Zell-Linie RAJI getestet, die den definierten HLA-Typ DR 3 aufweist (51). Als Kontrolle diente der bereits charakterisierte monoklonale Anti-HLA DR 3-Antikörper 16.23 (51). Der Antikörper K 14 erkennt eine monomorphe Determinante des HLA DR-Antigens (51). Er wird auf Zellen wie Monozyten, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten gefunden (Lander, persönliche Mitteilung).

Der Anti-HLA DR-Antikörper Q 5/13 ist aus einer humanen lymphoblastoiden B-Zell-Leukämie gewonnen und erfaßt monomorphe Anteile aller HLA DR- und einiger HLA DP (SB)-Antigene. CN 343 ist ein noch nicht ausreichend charakterisierter Antikörper, der vermutlich mit den HLA DR-assoziierten Immunantwort (Ia)-Antigenen reagiert (Giaccomini, persönliche Mitteilung).

Als zweiter Antikörper wurde ein speziell für Doppelimmunfluoreszenz hergestellter Fab'2-Antikörper verwendet. Der mit Fluoreszein konjugierte Antikörper FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat) reagierte mit den o.g. Antikörpern der IGG-Klasse, der mit Rhodamin konjugierte TRITC (Tetra-Methyl-Rhodamin-isothiozyanat) mit dem Antikörper K 14 der IGM-Klasse. Der gegen IGM gerichtete zweite Antikörper war zuvor durch Affinitätschromatographie mit einer mit IGG

beschichteten Säule von jeglicher Verunreinigung durch wirksame Anti-IGG-Antikörper-Klassen befreit worden.

2.4. Statistik

Die Ergebnisse der Lymphozytentypisierung wurden jeweils in Prozent von positiv markierten Zellen angegeben. Es wurde jeweils der Mittelwert der einzelnen Meßwerte gebildet und die Standardabweichung errechnet. Zum Vergleich, bzw. der Errechnung der Signifikanz zwischen den Werten wurden der Student t-Test angewandt. Zum Vergleich zweier Wertepaare wurde der Korrelationskoeffizient r bestimmt (61).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des HLA DR-Antikörpers K14 und der von ihm erkannten Determinante

Mit Hilfe der Kreuzinhibition von K14 durch verschiedene andere Anti-DR- und Anti-Ia-Antikörper konnte die Determinante, gegen die der Antikörper K14 gerichtet ist, näher definiert werden. Im Folgenden wurde geprüft, ob und inwieweit im Vergleich die Spezifität von K14 mit anderen Antikörpern übereinstimmt.

Um überhaupt eine Aussage über die Spezifität der Antikörper treffen zu können und um quantitative Unterschiede der Anti-DR- und Anti-Ia-Antikörper erkennen zu lassen, wurden periphere Blutlymphozyten von Patienten mit einer infektiösen Mononukleose verwendet, die erfahrungsgemäß einen großen Prozentsatz an aktivierten Ia-Antigen-positiven T-Zellen haben.

Die Resultate zeigen, daß im ersten Versuch mit dem Antikörper Q5-13 und CN 343 keine Inhibition des Antikörpers K14 stattfindet, jedoch in etwa der gleiche Prozentsatz an Ia-Antigen-positiven Zellen erkannt wird (Tab. 1). Mit dem Antikörper L243 findet teilweise eine Inhibition des Antikörpers K14 statt, der nur noch 6 % der Zellen statt vorher 32 bis 35 % bindet.

Ähnliche Resultate bringt der zweite Inhibitionsversuch, bei dem K14 als zweiter Antikörper eingesetzt wurde. Durch den AK L243 findet eine verminderte Bindung des AK K14 auf nur 18 % der Zellen gegenüber vorher 26 % der Zellen statt - also wieder eine Teilinhibition -, während Q5/13 und CN343 den AK K14 nicht inhibieren. Bei diesem zweiten Versuch reagieren die Antikörper Q5/13 und CN343 mit etwa doppelt so viel Zellen wie der Antikörper K14.

3.2. Korrelation des Antikörpers K14 mit dem Antikörper L243 bei Diabetikern und Normalpersonen

Ein Vergleich der Antikörper K14 und L243 bei allen untersuchten Patienten und Kontrollpersonen zeigte einen durchwegs höheren Anteil von L243 positiven Zellen bei beiden Kollektiven. In einem Paarvergleich (Abb. 2) konnte gezeigt werden, daß trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in der Anzahl an K14, bzw. L243 positiven peripheren Blutlymphozyten bei Diabetikern und Normalpersonen eine signifikante Korrelation der Antikörper untereinander besteht ($p < 0,001$).

3.3. Doppelimmunfluoreszenz von peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit infektiöser Mononukleose

Der Antikörper K14 wird, wie oben berichtet, auf B-Lymphozyten, NK-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten sowie auf akzessorischen Zellen des Immunsystems wie den Makrophagen exprimiert. Mit der Methode der Doppelimmunfluoreszenz sollten die Ia-, d.h. K14-positiven Zellen charakterisiert und deren Zugehörigkeit zu Helfer-, Suppressor-T-Lymphozyten-Subpopulationen, oder anderen immunkompetenten mononukleären Zellen wie B-Lymphozyten bestimmt werden.

In einem Vorversuch (Tab. 2) wurde ein Doppelimmunfluoreszenzversuch an peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit einer infektiösen Mononukleose durchgeführt. Beim Vergleich der bei Einfach- und bei Doppelmarkierung erhobenen Daten bezüglich der einzelnen Spezifitäten von Leu2/3/4 waren keine Unterschiede ersichtlich, so daß eine Kreuzreaktion der Antikörper untereinander und somit falschpositive Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden können.

Bei der Untersuchung an zwei verschiedenen Patienten mit infektiöser Mononukleose zeigte sich eine deutliche Erhöhung von Leu2/K14 positiven doppelmarkierten Zellen. Es kann also davon ausgegangen werden, daß bei dieser Erkrankung hauptsächlich zytotoxische oder auch Supressorzellen aktiviert werden.

3.4. Leuko- und Lymphozytenzahlen bei Diabetikern

Zur Beurteilung von immunpathologischen Veränderungen während des Krankheitsverlaufs eines Diabetes mellitus wurden die Ergebnisse der diabetischen Patienten nicht nur zu denen der Normalpersonen, sondern auch unter Berücksichtigung der Diabetesdauer zueinander in Vergleich gestellt. Es wurden zwei Gruppen A und B gebildet: Gruppe A umfaßte 10 Typ-I-Diabetiker im Alter von 12 - 40 Jahren (24 ± 9), bei denen der Zeitpunkt der Diagnosestellung weniger als 7 Tage zurücklag. Gruppe B umfaßte weitere 10 Typ-I-Diabetiker im Alter von 14 - 30 Jahren (22 ± 6) mit einer Diabetesdauer zwischen 14 Tagen und 8 Monaten. Die durchschnittlichen HbA_{1c} -Werte in Gruppe A lagen bei $11,6 \pm 1,3 \%$, in Gruppe B bei $10,3 \pm 1,4 \%$. (Normalbereich: bis $6,0 \%$)

Die durchschnittliche Leukozytenzahl der 20 diabetischen Patienten lag mit $6415 \pm 893 \times 10^6/l$ (SEM) im mittleren Normbereich ($4 - 10 \times 10^9/l$); die prozentuale Lymphozytenzahl lag bei 33% (Tab. 3). Der Vergleich von Leuko- und Lymphozyten der Gruppe A und B zeigt, daß kurz nach Manifestation in Gruppe A bei relativ niedrigen Leukozytenwerten von $5570 \pm 704 \times 10^6/l$ (SEM) die Lymphozytenzahl mit $2320 \pm 236 \times 10^6/l$ ($43 \pm 3 \%$) signifikant höher liegt als in Gruppe B mit durchschnittlich $7260 \pm 1698 \times 10^6/l$ (SEM) Leukozyten und davon nur $1877 \pm 166 \times 10^6/l$ (SEM) Lymphozyten ($32 \pm 4 \%$) ($p < 0.05$) (Abb. 4).

3.5. HLA-Typisierung bei insulinpflichtigen Diabetikern

14 von 21 Patienten wurden HLA-typisiert. Davon trugen 5 Patienten HLA-DR3/4-Antigen, 6 Patienten HLA DR4/X-Antigen und 2 Patienten HLA-DR3/X-Antigen. Bei einem einzigen Patienten wurde weder DR3/4 gefunden, sondern HLA DR2/5.

3.6. T-Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit unterschiedlicher Diabetesdauer

Tabelle 5 zeigt die durchschnittlichen Ergebnisse der Lymphozytensubpopulation. Der Prozentsatz der Leu2 (Suppressor/zytotoxischen T-Lymphozyten) positiven Zellen lag sowohl in Gruppe A mit $23 \pm 6 \%$, als auch in Gruppe B mit $19 \pm 8 \%$ etwas unter den Normwerten ($28 \pm 8 \%$, Becton Dickinson). Die Leu3 positiven Zellen (Helferzellen) lagen in Gruppe A mit $50 \pm 13 \%$ über, in Gruppe B mit $40 \pm 17 \%$ unter dem Normbereich ($45 \pm 9 \%$, Becton Dickinson). Auch die Leu4 positiven Zellen lagen in beiden Gruppen (A: $63 \pm 12 \%$, B: $53 \pm 20 \%$) unter dem Mittelwert der Kontrollwerte ($75 \pm 7 \%$, Becton Dickinson).

Auffallend ist bei all den Ergebnissen der diabetischen Patienten die Streubreite der Werte und damit eine um ein vielfaches erhöhte Standardabweichung gegenüber Normalkollektiven. Dies veranschaulicht besonders gut die graphische Darstellung der Einzelergebnisse der Lymphozytensubpopulationen in Abbildung 5.

3.7. B-Lymphozyten bei Diabetikern unter Berücksichtigung der Diabetesdauer und deren Korrelation zu K14, bzw. L243 positiven Zellen

Der Zahl der Leu12 (B-Lymphozyten) positiven Zellen ist in Gruppe A mit $14 \pm 9 \%$ signifikant höher als in Gruppe B mit $5 \pm 2 \%$ ($p < 0,005$) (Tab. 5).

Die Immunantwortantigene (IA-AG), die von den Antikörpern K14 und L243 erkannt werden, werden, wie oben berichtet, auch auf B-Lymphozyten exprimiert. Ein Paarvergleich zwischen den von dem Antikörper Leu12 markierten Zellen zu den K14, bzw. L243 gebundenen Zellen zeigt, daß keine signifikante Korrelation zwischen dem Abfall der B-Lymphozyten bei zunehmender Diabetesdauer und der Zahl der K14 positiven Zellen besteht (Abb. 3).

3.8. K14 und L243 positive mononukleäre Zellen bei Diabetikern und Normalpersonen

Patienten mit neu manifestiertem Typ-I-Diabetes zeigten eine signifikante Vermehrung von K14 und L243 positiven Zellen verglichen mit einer Gruppe gesunder Normalpersonen (Tab. 6). Die Mittelwerte aller untersuchten Diabetiker ($n = 20$) sind für K14 ($14 \pm 5 \%$) und L243 ($24 \pm 9 \%$) deutlich höher als die der Kontrollgruppe ($n = 10$) für K14 ($5 \pm 2 \%$) und L243 ($11 \pm 6 \%$). (Für K14 $p < 0,001$. Für L243 $p < 0,002$).

Außerdem läßt sich im Vergleich der Gruppe A zu Gruppe B für den Antikörper K14 eine Tendenz der Abnahme der positiven Zellen mit zunehmender Diabetesdauer beobachten. (K14: Gruppe A = $16 \pm 5 \%$,

Gruppe B = $11 \pm 4 \%$, $p < 0,05$). Gruppe B liegt mit $11 \pm 4 \%$ positiver Zellen noch signifikant über der Kontrollgruppe C mit $5 \pm 2 \%$ positiver Zellen ($p < 0,02$).

Die Quantifizierung des Antikörpers L243 zeigt innerhalb der ersten acht Monate der Diabeteserkrankung keine signifikanten Veränderungen (Abb. 6).

3.9. Doppelimmunfluoreszenz von mononukleären Zellen bei Diabetikern mit den Antikörpern Leu2, bzw. Leu3 und K14

Im Unterschied zu den Ergebnissen bei Patienten mit infektiöser Mononukleose (siehe 6.3.) waren mit der Doppelimmunfluoreszenzmethode bei diabetischen Patienten keine doppelmarkierten mononukleären Zellen, d.h. Leu2 plus K14 bzw. Leu 3 plus K14 positiven Zellen, nachweisbar (Tab. 3).

3.10. Vergleich von Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit und ohne Inselzellantikörper

Im Folgenden wurde die mögliche Korrelation im Vorhandensein von Inselzellantikörpern und quantitativen Veränderungen von Lymphozytensubpopulationen untersucht (Tab. 7). Dabei ergaben sich bei ICA positiven, bzw. negativen Patienten im Durchschnitt gleiche Prozentzahlen für Lymphozyten und Ia-Antigen-tragende Zellen.

Tabelle 1: Kreuzinhibition von K14, bzw. L243 durch verschiedene Anti-DR und Anti-IA-Antikörper an Mononukleose-Zellen

1. Antikörper	2. Antikörper	FITC=goat-anti-mouse IgG, fluorescein conj.	TRITC=rabbit anti-mouse IgM, Rhodamin conj.	FITC + TRITC K48 K46
K14			32 %	
	Q5/13	39 %		
K14	Q5/13	36 %	34 %	34 %
	343 CN	31 %		
K14	343 CN	37 %	35 %	35 %
	L243	26 %		
K14	L243	28 %	6 %	4 %
L243		57 %		
	K14		26 %	
L243	K14	59 %	18 %	18 %
Q5/13		52 %		
Q5/13	K14	50 %	26 %	26 %
363 CN		52 %		
363 CN	K14	49 %	25 %	18 %

Tabelle 2

Doppelimmunfluoreszenz von peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit infektiöser Mononukleose

1. Antikörper	2. Antikörper	FITC (Leu) (%)	TRITC (K14) (%)	FITC + TRITC Leu + K14(%)
Leu2 (Patient 1)		60		
Leu2	K14		64	
Leu3	K14	78	65	43
Leu3		9		
Leu3	K14	5	56	2
Leu4		83		
Leu4	K14	84	59	15
Leu12		5		
Leu12	K14	3	63	0
Leu2 (Patient 2)		73		
Leu2	K14		56	
Leu2	K14	82	56	30
Leu3		18		
Leu3	K14	13	53	2
Leu12		3		
Leu12	K14	10	50	2

Tabelle 3: Zusammenstellung der immunologischen und genetischen Daten bei Diabetikern
mit unterschiedlicher Diabetesdauer

Patient NR	Alter Jahre	Leuko n/mm ³	Lympho n/mm ³	Leu2 %	Leu2+ K14 %	Leu3 K14 %	Leu3+ K14 %	Leu4 %	Leu12 %	K14 %	L243 %	HLA DR-	ICA	HbA _{1c} %	Dauer
1.	18	4000	2350	16	0	66	0	n.d.	26	13	24	4/0	n.d.	12,3	1 Tg
2.	26	4200	2100	28	0	64	0	70	18	29	29	4/0	n.d.	9,6	1 Tg
3.	36	8400	2940	24	0	36	0	45	2	13	20	4/0	neg.	12,8	1 Tg
4.	14	5100	2244	25	0	57	0	81	n.d.	17	n.d.	3/4	1:4	12,2	4 Tg
5.	16	3400	1666	35	0	36	2	66	26	12	n.d.	3/5	1:64	n.d.	4 Tg
6.	25	8600	2838	19	0	66	0	74	12	18	21	3/4	1:32	11,8	5 Tg
7.	30	3300	957	18	0	57	0	58	n.d.	12	17	n.d.	neg.	9,7	5 Tg
8.	12	8200	3200	23	0	42	0	66	11	20	49	2/5	neg.	11,0	5 Tg
9.	20	4400	1848	24	0	40	0	48	6	16	23	4/w14	1:8	12,9	6 Tg
10.	40	6100	3050	14	0	40	0	57	n.d.	15	23	n.d.	neg.	12,6	7 Tg

Patient Nr.	Alter Jahre	Leuko n/mm ³	Lympho n/mm ³	Leu2 %	Leu2+ K14 %	Leu3 %	Leu3+ K14 %	Leu4 %	Leu12 %	K14 %	L243 %	HLA DR-	ICA	HbA _{1c} %	Dauer
11.	16	19600	3136	6	0	22	1	47	5	13	19	1/4	1:64	10,4	15 Tg
12.	22	4900	2009	20	0	47	0	70	2	16	26	n.d.	n.d.	10,0	18 Tg
13.	16	7600	2056	21	0	50	0	53	n.d.	6	n.d.	1/4	n.d.	10,4	19 Tg
14.	29	6900	1587	29	0	53	0	63	7	14	17	n.d.	n.d.	9,9	21 Tg
15.	27	4600	1748	24	0	25	0	28	n.d.	7	n.d.	3/4	neg.	10,9	21 Tg
16.	14	2700	1431	8	0	5	0	17	2	15	37	1/3	1:8	10,2	24 Tg
17.	23	12400	1984	14	0	44	0	n.d.	8	13	14	n.d.	n.d.	11,5	3 Mo
18.	26	4300	1548	17	0	40	0	79	n.d.	12	n.d.	3/4	neg.	8,9	4 Mo
19.	18	4400	1452	26	0	49	0	53	7	4	18	n.d.	n.d.	7,9	5 Mo
20.	25	5200	1820	29	0	60	0	67	7	13	27	n.d.	n.d.	13,2	8 Mo
21.	22	3900	1599	38	0	34	0	81	3	14	29	3/4	1:64	n.d.	

Tabelle 4: K14 und L243 pos. T-Lymphozyten bei
Normalpersonen

Patient NR	Alter Jahre	K14 %	L243 %
1.	18	7	27
2.	17	2	14
3.	24	7	11
4.	25	4	10
5.	26	2	9
6.	40	5	11
7.	27	7	6
8.	40	8	9
9.	28	3	4
10.	30	2	14

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der T-Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit unterschiedlicher Diabetesdauer und Normalpersonen

	Leu2 = Suppressor + zytotoxische Zellen (x + SD)	Leu3 = Helfer- zellen (x + SD)	Leu4 = Pan-T- Zellen (x + SD)	Leu12 = B-Lympho- zyten (x + SD)
Gruppe A n=10 (DD $\leq$ 7 Tg)	23 + 6 %	50 + 13 %	63 + 12 %	14 + 9 %
Gruppe B n=10 (DD 14 Tg-8 Mo)	19 + 8 %	40 + 17 %	53 + 20 %	5 + 2 %
Normalpersonen (Normbereich Bect.Dickinson)	28 + 8 %	45 + 9 %	75 + 7 %	10 + 5 %

p $\leq$ 0,05

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen von K14 und L243 positiven Lymphozyten bei Diabetikern und Normalpersonen unter Berücksichtigung der Diabetesdauer (Gruppe A $\leq$ 7 Tg, Gruppe B 14 Tg-8 Mo, Gruppe C = Normalpersonen)

	K14($\bar{x} \pm SD\%$)	L243($\bar{x} \pm SD\%$)	
Patienten ges. n = 20	14 $\pm$ 5	24 $\pm$ 9	$p \leq 0,002$
Normalpersonen n=10	5 $\pm$ 2	11 $\pm$ 6	
	K14($\bar{x} \pm SD\%$)	L243($\bar{x} \pm SD\%$)	
Gruppe A	16 $\pm$ 5	26 $\pm$ 10	$p \leq 0,01$
Gruppe B	11 $\pm$ 4	23 $\pm$ 8	
Gruppe C	5 $\pm$ 2	11 $\pm$ 6	

Tabelle 7: Vergleich von Lymphozyten-Subpopulationen und K14/L243 positiven Zellen bei Diabetikern mit und ohne Inselzellantikörper (ICA)

	Leu2 (x ₁ SD%)	Leu3 (x ₁ SD%)	Leu4 (x ₁ SD%)	K14 (x ₁ SD%)	L243 (x ₁ SD%)
ICA positive Pat. n=7	22 ± 12	37 ± 20	59 ± 24	15 ± 2	26 ± 7
ICA negative Pat. n=6	20 ± 4	40 ± 10	55 ± 18	13 ± 4	27 ± 15

Tabelle 8 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Antikörper	Beschreibung	M6 des Antigens	Normbereich von Lymphozyten in % (x $\pm$ SD)	Ig-Kette Zusammen- setzung	Klon
Anti-Leu-2a	T-zytotoxische/ Suppressorzellen	32-43 K	28 $\pm$ 8	IgG _{2a} ^K	SK1
Anti-Leu-3a+b	T-Helfer/ "Inducer"-Zellen	55 K	45 $\pm$ 9	IgG ₁ ^K	SK4/3 SK3
Anti-Leu-4	T-Zellen	20-30 K	75 $\pm$ 7	IgG ₁ ^K	SK7
Anti-Leu-12	B-Zellen	N.D.	10 $\pm$ 5	IgG ₁ ^K	4G7
Anti-HLA-DR	B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen	28-34 K	11 $\pm$ 4	IgG _{2a} ^K	L243

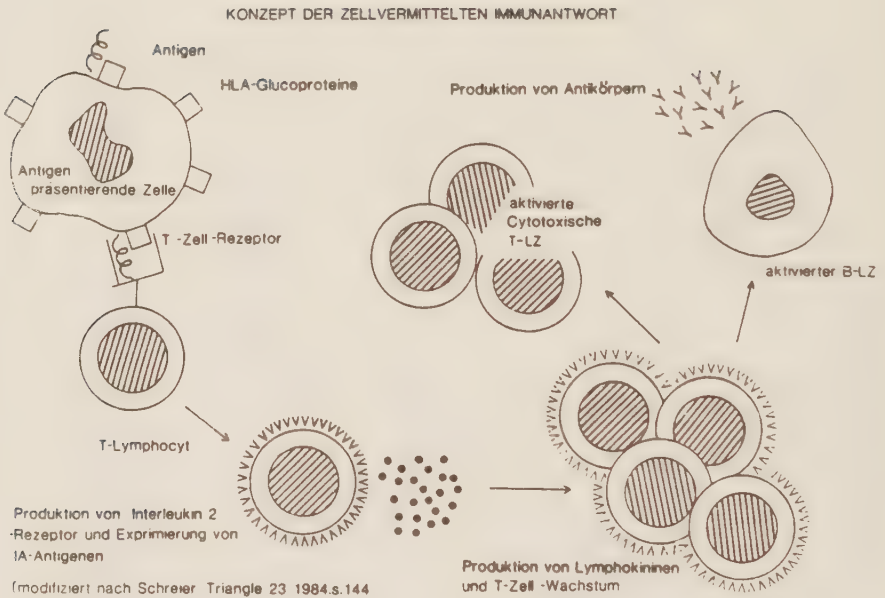


Abbildung 1 : Konzept der zellvermittelten
Immunantwort (modifiziert nach
Schreier Triangle 23 1984.s.144)

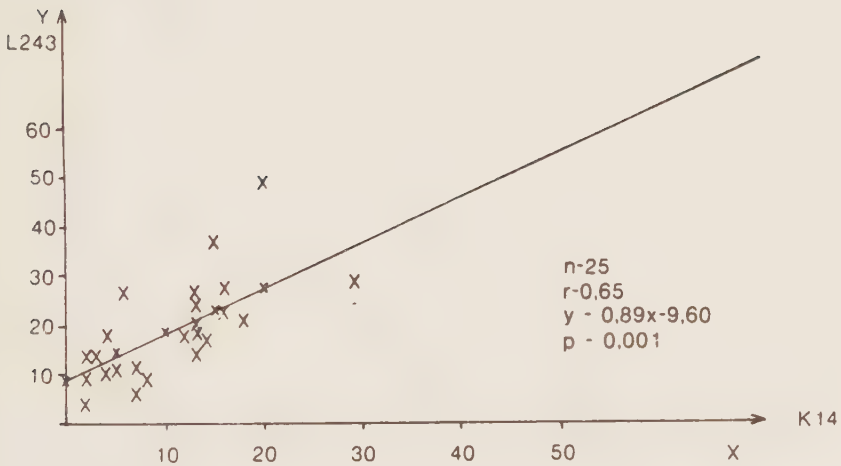


Abbildung 2 : Korrelation von K 14 und L 243 bei Diabetikern und Normalpersonen

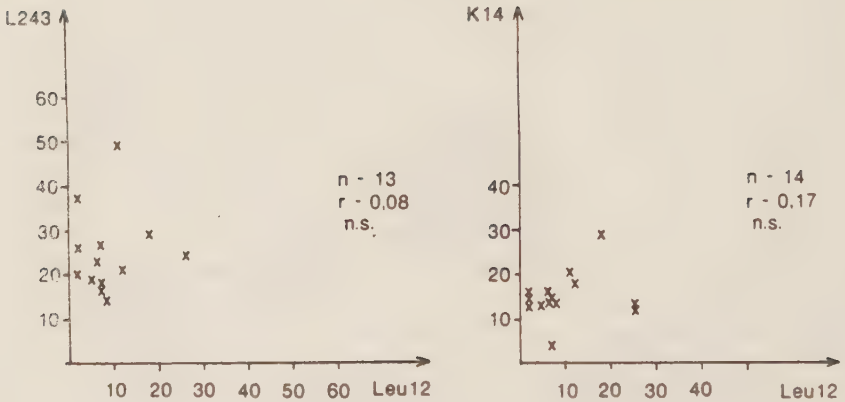


Abbildung 3 : Korrelation zwischen K 14 und Leu 12
und zwischen L 243 und Leu 12 bei Diabetikern
und Normalpersonen

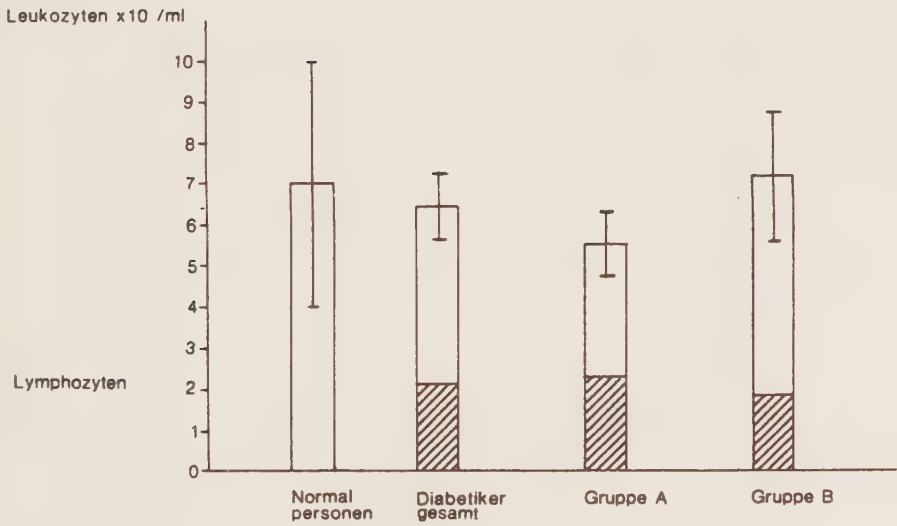


Abbildung 4 : Leukozyten und Lymphozyten bei Diabetikern mit unterschiedlicher Diabetesdauer

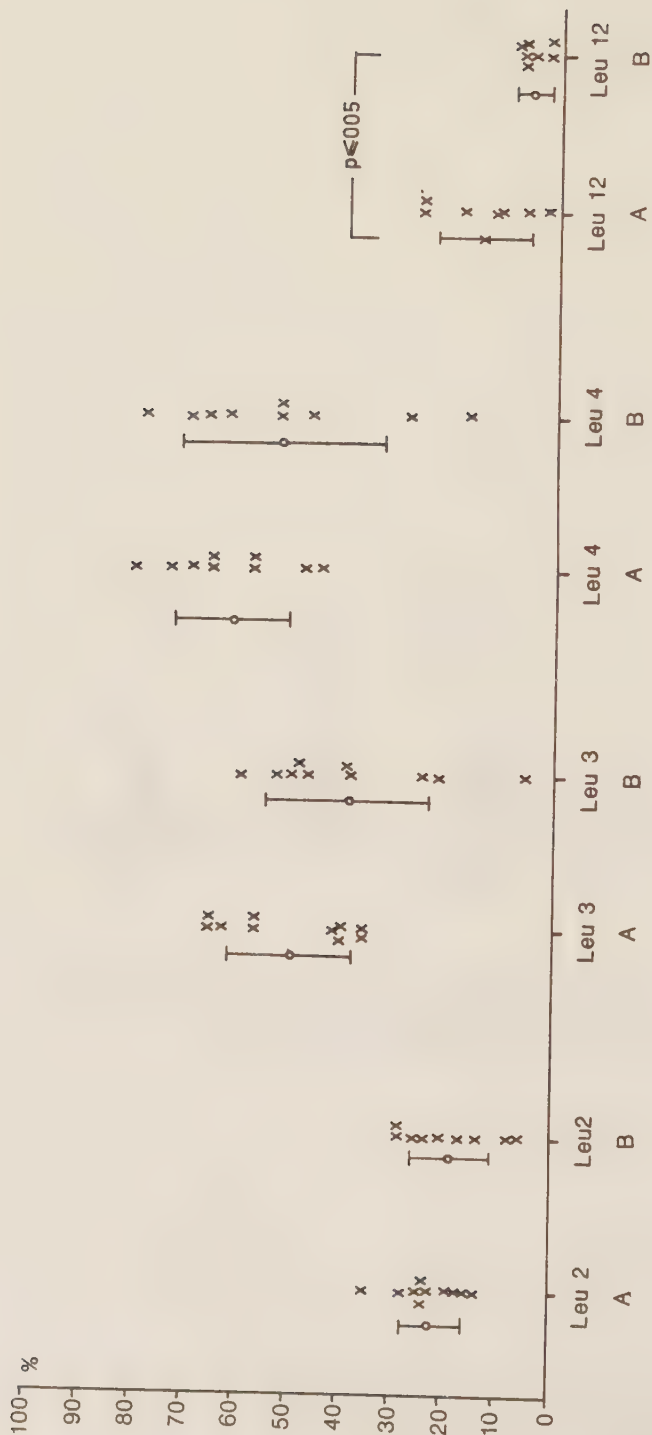


Abbildung 5 : T-Lymphozyten-Subpopulationen bei Diabetikern mit unterschiedlicher Diabetesdauer (Gruppe A < 7 Tg, Gruppe B : 14 Tg - 8 Mo)

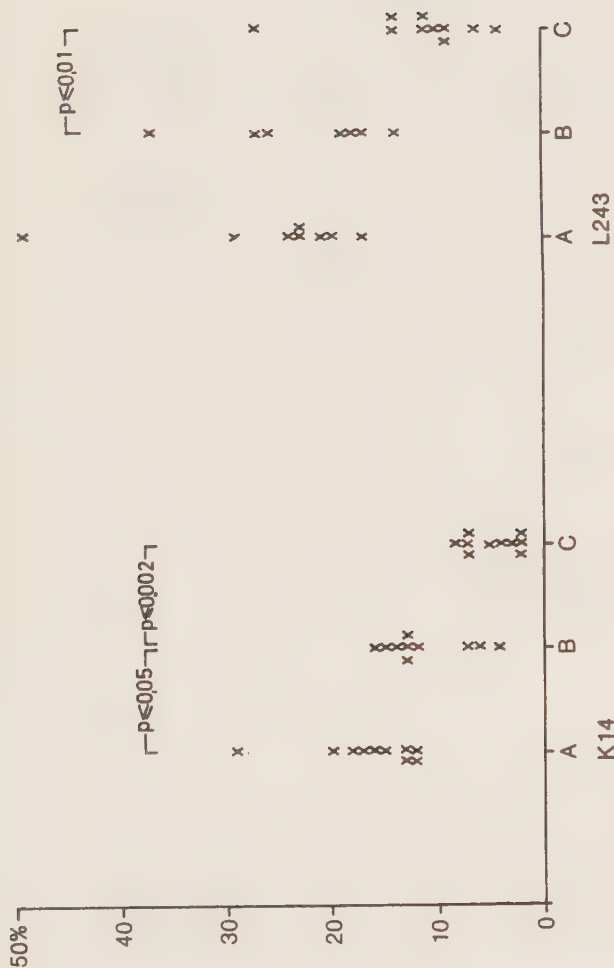


Abbildung 6: K 14- und L 243-positive Lymphozyten bei Diabetikern und Normalpersonen unter Berücksichtigung der Diabetesdauer (Gruppe A < 7 Tg, Gruppe B: 14 Tg - 8 Mo, Gruppe C Normalpersonen)

4. Diskussion

4.1. Zur Ätiologie und Pathogenese des Typ I Diabetes mellitus

4.1.1. Hypothesen über den Vererbungsmodus

Die Familiarität der Zuckerkrankheit wurde schon im Altertum beobachtet und aufgrund einer Unzahl von Einzelberichten über den Erbgang und die Bedeutung genetischer Faktoren bis in das 20. Jahrhundert postuliert (50). Bis zu Beginn der 60er Jahre wurde ein Erbgang gemäß den klassischen Mendelschen Regeln angenommen, wobei Überlegungen über Homo- und Heterogenität des Erbgangs im Vordergrund standen. Pincus und White (42) plädierten für Rezessivität bei homogener Vererbung, während Cammidge als erster die Heterogenitätshypothese aufstellte (9). Daneben wurde über gonosomale, autosomal-dominante und auch additive Vererbungsmöglichkeiten diskutiert. Durch Untersuchungen an eineiigen, also genetisch identischen Zwillingspaaren konnte schon sehr früh (56,57,60) eine Erkrankung rein genetischer Herkunft ausgeschlossen werden. Nur etwa die Hälfte der diabetischen Zwillingspaare zeigten eine Konkordanz im pathologische Stoffwechselverhalten, so daß neben genetischen auch noch andere exogene diabetogene Faktoren eine Rolle spielen mußten.

4.1.2. HLA und Diabetes mellitus

1973 stellten Singal und Blajchman (53) erstmalig bei juvenilen Diabetikern eine unerwartet hohe Frequenz des HLA-Antigens Bw 15 fest. 1972 hatten Finkelstein et al. (13) noch berichtet, keine Assoziation zwischen HLA und juvenilem Diabetes gefunden zu haben.

Nerup et al. (11) und etwas später Cudworth und Woodrow konnten 1974 eine statistisch signifikante Assoziation des juvenilen Diabetes mit HLA Bw 15 und darüberhinaus mit B 8 nachweisen. Die jüngste Forschung hat gezeigt, daß der Typ-I-Diabetes hochsignifikant positiv mit dem HLA DR3 und/oder HLADR4-Antigen assoziiert ist, wobei ein Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA B8 und HLA DR3 gefunden wurde. Goldmann (18) konnte nachweisen, daß 9 von 54 Patienten (17 %) sowohl HLA DR3 als auch HLA DR4-Antigen aufwiesen und daß 48 von 54 Patienten (88 %) HLA DR3 und/oder DR4-Antigen trugen.

Auf Grund der beschriebenen HLA-Diabetes-Assoziation läßt sich für die Betroffenen ein bestimmtes Erkrankungsrisiko für die Wahrscheinlichkeit, irgendwann an Diabetes zu erkranken, festlegen, das jedoch hinsichtlich praktisch klinischer Belange wie einer genetischen Beratung nicht verwertbar ist.

4.1.3. Zelluläre Autoimmunphänomene

Die Diskussion um eine Autoimmunpathogenese des Typ-I-Diabetes begann Anfang der 70er Jahre mit dem Nachweis von Inselzellantikörpern durch Botazzo und Mitarb. (2,52,3) und der Beobachtung zellulärer Immunphänomene gegen Pankreasinselfzellen bei diabetischen Patienten durch Nerup et al. (39).

Erste Hinweise für eine Entzündung der β -Zellen lieferten Anfang des 20sten Jahrhunderts Veröffentlichungen über mononukleäre Zellinfiltrate im Pankreas von diabetischen Patienten. 1965 fand Gepts bei 68 % von Autopsien jugendlicher Diabetiker, die innerhalb der ersten 6 Monate nach Manifestation verstorben waren, als charakteristischen Befund eine lymphozytäre Infiltration der In-

selzellen im Sinne einer Insulitis (16,17). Obwohl Doniach und Morgan keinerlei Entzündungszeichen nachweisen konnten, wurde der Befund 1977 von Nerup und Mitarb. bestätigt (10).

1971 fanden Nerup et al. (39) und später McCuish (36) bei juvenilen diabetischen Patienten kurz nach Manifestation der Erkrankung Anzeichen einer zellulären Immunität gegen endokrine Zellen des Pankreas. Durch Verwendung von Antigenhomogenaten aus verschiedenen Organen (Leber, Niere, Pankreas) und von verschiedenen Spezies (Mensch, Schwein, Rind) konnten sie mittels des Leukozytenmigrationstests nachweisen, daß die beobachteten Immunitätszeichen eindeutig organspezifisch auftraten, ohne dabei eine Artspezifität aufzuweisen.

1976 konnten Huang und McLaren (23) bei in vitro-Untersuchungen zeigen, daß Lymphozyten diabetischer Patienten zytotoxisch gegen-über β -Zellen sind.

Wichtige Komponenten des zellulär-immunologischen Netzwerkes sind zwei Subklassen der T-Lymphozyten: die Helfer-Zellen, die eine Immunreaktion einleiten und die Suppressor-Zellen, von denen vermutet wird, daß sie beim Gesunden für die Regulation der Immuntoleranz verantwortlich sind (37). Diese beiden Unterklassen, sowie B- und T-Lymphozyten unterscheiden sich in ihren Oberflächenstrukturen (Antigenen). Die Erhältlichkeit einer großen Menge von monoclonalen Antikörpern gegen diese spezifischen Oberflächenantigene (29) ermöglichte es erstmals, quantitative Bestimmungen der Lymphozytensubpopulationen vorzunehmen.

Buschard et al. berichtete 1983 über Verschiebungen im Verhältnis Helfer/Suppressor-Zellen innerhalb der ersten Woche nach Diagnosestellung eines Typ-I-Diabetes zugunsten der Helfer-Zellen (8). Herold et al. fanden 1984 eine signifikante Verminderung der Helfer-Zellen kurz nach Diagnosestellung und vereinzelt Autoantikörper gegen diese Zellen (22). Ilomnen et al. (24) und auch Qui-niqu-Debrie et al. (47,49) konnten etwas später eine relative

Vermehrung der Suppressorzellen nachweisen. Pozzilli (44) hingegen beobachtete eine Verminderung dieser Zellen.

Eisenbarth und Mitarb. (25) und später Alviggi (1) berichteten, daß viele der diabetischen Patienten eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden T-Zellen aufweisen, die auf der Zelloberfläche HLA DR-Antigene oder sogenannte Ia-Antigene (Immune response associated-antigen) tragen. Man nimmt an, daß T-Zellen das HLA DR-AG nur exprimieren, wenn sie aktiviert sind. Srikanta et al. (54) konnte in einer prospektiven Studie sowohl bei Patienten in einer "prä-diabetischen" Phase vor Manifestation eines Typ-I-Diabetes, als auch bei normoglykämischen Verwandten ersten Grades (55) von Typ-I-Diabetikern den Nachweis einer erhöhten Anzahl Ia-positiver T-Zellen erbringen.

Alle diese Berichte zeigen bisher keine klare Übereinstimmung hinsichtlich der zellulären Immundefekte bei insulinpflichtigen Diabetikern. Dies könnte mit Unterschieden der eingesetzten monoklonalen Antikörper, aber auch mit der Heterogenität der untersuchten Probanden hinsichtlich Diabetesdauer, Manifestationszeitpunkt und immunologischen bzw. immungenetischen Faktoren zusammenhängen.

4.1.4. Humorale Immunphänomene

Bottazzo et al. (3) berichteten erstmals 1974 über das Vorkommen von humoralen IGG-Antikörpern gegen pankreatische Inselzellen. Ivrin et al., Lendrum et al. und Nerup et al. konnten etwas später den Nachweis von cytoplasmatischen Inselzellantikörpern ICA bei etwa 60 - 85 % der juvenilen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bestätigen (40). Während die Inselzellantikörper mit intrazellu-

lären Strukturen aller endokriner Pankreaszellen reagieren, gelang Lernmark 1978 (32) die Entdeckung eines β -Zell-spezifischen neuen Antikörpers, der sich mit einem Oberflächenprotein der Inselzelle verbindet. Von diesen Antikörpern wurde inzwischen auch eine zellschädigende Wirkung auf insulinsezernierende Inselzellen beschrieben (3).

4.1.5. Tierexperimente

Entscheidende Erkenntnisse zur Pathogenese des Diabetes mellitus wurden durch tierexperimentelle Versuche an verschiedenen Mäuse- und Rattenzüchtungen gewonnen.

1977/78 erweckte vor allem das Tiermodell der BB-Ratte sehr großes Interesse. Die Bio-Breeding Wistar Ratte (39) entwickelt spontan innerhalb von 60 - 120 Tagen einen insulinpflichtigen Diabetes, der alle Anzeichen einer Autoimmunerkrankung aufweist (35). Neben einer Insulitis mit lymphozytärer Infiltration der Inselzellen und β -Zell-Degeneration und dem Nachweis von Inselzellantikörpern zum Zeitpunkt der Manifestation des Diabetes war eine für die Pathogenese des humanen Typ-I-Diabetes entscheidende Beobachtung die Tatsache, daß sowohl zelluläre als auch humorale Autoimmunphänomene gegen die Pankreasinseln der Manifestation der Krankheit vorausgehen, und daß durch frühzeitige Immunsuppression im Tiermodell (z.B. durch Cyclosporin A) die Manifestation des Syndroms Diabetes zu verhindern ist (34).

Ein analoges Model zur BB-Ratte liegt inzwischen in der sogenannten NOD (= non obese diabetic)-Maus vor (36b), die innerhalb der ersten 21 Tage einen insulinpflichtigen Diabetes entwickelt.

4.2. Wissenschaftliche Grundlagen

Zum Verständnis der Zielsetzung und der durchgeführten Experimente ist eine kurze Erläuterung des derzeit favorisierten Konzepts der Immunantwort notwendig (siehe Abb. 1): Ein fremdes oder körpereigenes Antigen wird nach "Aufbereitung" durch eine unspezifisch reagierende Zelle z.B. der Makrophagenreihe von einem T-Helfer-Lymphozyt mit Hilfe eines Antigenrezeptors erkannt. Diese Erkennungsprozeß löst im Normalfall die Aktivierung des gesamten Immunsystems aus und funktioniert nur, wenn Makrophage und T-Zelle identische HLA-DR-Antigene aufweisen (5). Der HLA DR-Locus ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr. 6 lokalisiert und setzt sich aus den bisher definierten Subloci DR, DQ (früher MB, DC, DS) und DP (früher SB) zusammen. Diese HLA DR-Antigene spielen eine entscheidende Rolle in der Immunantwort und Regulation und werden auf der Oberfläche von immunkompetenten Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen (natural killer cells), Endothelzellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert.

Normalerweise übernehmen Makrophagen die Funktion der Antigenpräsentation. Ein durch ein Antigen aktivierter T-Helfer-Lymphozyt proliferiert und aktiviert über Lymphokine und T-cell-growth-factor zytotoxische T-Lymphozyten, die eine Destruktion der Zielzelle hervorrufen können, und B-Lymphozyten, die selektiv Immunglobuline gegen das Antigen sezernieren.

Ein Suppressor-T-Lymphozyt reguliert die Immunantwort. Man vermutet, daß die Selbsttoleranz, d.h. die Tatsache, daß Oberflächenantigene auf körpereigene Zellen beim Gesunden keine Antikörperreaktion auslösen können, abhängig ist von der Funktion der Suppressorzellen. Ein Mangel dieser Zellen, ebenso eine Dysfunktion oder auch eine überschießende Aktivität der Helferzellen könnte für das Entstehen einer Auto-Immunität verantwortlich sein.

4.3. Eigene Ergebnisse zur Spezifität des Antikörpers K 14

Zur Typisierung der Ia-Antigen-tragenden Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem inzwischen käuflichen, von Jackson (25) und Alviggi (1) eingesetzten Antikörper L 243 ein neuer Anti-Ia-Antikörper K 14 verwendet.

Dieser gegen eine monomorphe Determinante des HLA DR-Moleküls gerichtete Maus-IGM-Antikörper (51) wurde durch eigene vergleichende Versuche mit dem Maus-IGG-Antikörper L 243 und mit zwei weiteren DR Antikörpern Q 5/13 und CN 343 getestet. Dieser Vergleich zeigte bei 15 Patienten und 10 Kontrollpersonen eine durchwegs höhere prozentuale Bindung des Antikörpers L 243 an periphere mononukleäre Zellen bei einer signifikanten Korrelation der beiden Antikörper ($p < 0,001$, Abbildung 2). Dies erlaubt die Annahme, daß K 14 ein polymorphes Allel des von L 243 erkannten Immunantwortgens bindet. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der Inhibitionsversuche an in vivo Epstein-Bar-Virus transformierten peripheren Blutlymphozyten (Infekt. Mononukleose). Teilweise inhibieren sich K14 und L243 gegenseitig bei der Bindung an die entsprechenden Rezeptorepitope. Das bedeutet, daß die beiden Antikörper benachbarte, aber nicht identische Determinanten erkennen.

4.4. Ia-Antigen-positive mononukleäre Zellen

Die Typisierung der peripheren Blutlymphozyten mit den Anti-Ia-Antikörpern L 243 und K 14 wurde an 20 insulinpflichtigen Diabetikern durchgeführt. 10 konnten schon innerhalb der ersten 6 Tage, weitere 6 innerhalb der ersten 4 Wochen und 4 bis zu 8 Monaten nach Diagnosestellung untersucht werden. Bei allen Patienten war eine erhöhte Zahl an im peripheren Blut zirkulierenden L 243 und K 14

positiven Zellen nachweisbar (Tabelle 6).

Mit dem Antikörper K 14 war außerdem ein signifikanter Unterschied in der Höhe der positiven Zellen zwischen Patienten mit einer sehr kurzen Diabetesdauer (< 7 Tage) und Patienten mit einer längeren Diabetesdauer (bis zu 8 Monaten) erkennbar ($p < 0,05$, Abbildung 6). Normalpersonen hatten gegenüber beiden Kollektiven deutlich niedrigere Werte ($p < 0,002$).

Bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wurden in den letzten Jahren funktionelle und quantitative Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen nachgewiesen. Richman et al. (48) konnte schon 1976 eine Verminderung der Suppressor-Lymphozyten bei Patienten mit Myasthenia gravis feststellen. Nussenblatt (41) erhob den gleichen Befund bei Patienten mit Uveitis, Volpé (59) bei Patienten während der hyperthyreoten Phase eines Morbus Basedow.

Diese Erkenntnisse führten dazu, auch bei Typ I Diabetikern nach Veränderungen der zellulären Abwehr zu suchen.

Über die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde weiter oben (siehe 4.1.2) ausführlich berichtet.

1981 diagnostizierte Jackson et al. (26) erstmals an durch Rosettentechnik angereicherten T-Zell-Populationen bei unbehandeltem Morbus Basedow eine erhöhte Anzahl an aktivierten, Ia-positiven T-Lymphozyten.

Die Bedeutung dieser Phänomene für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist noch nicht endgültig geklärt. Die T-Zellen von Normalpersonen exprimieren Immunantwortgene z.B. dann, wenn sie durch ein exogenes Antigen stimuliert werden (28). Erhöhte Zahlen von aktivierten T-Lymphozyten wurden bisher beim Morbus Basedow, aber auch nach viralen Infektionen (27) und bei Erkrankungen mit ebenfalls autoimmunologischem Hintergrund wie der rheumatoiden Arthritis (7) und dem Lupus erythematoses (64) vorgefunden. Sie deuten auf eine Aktivierung der zellulären Immunantwort hin.

Jackson et al. berichtet erstmals bei 14 Typ-I-Diabetikern, davon 9 mit einer Diabetesdauer unter 6 Monaten, über eine Vermehrung der L243 (= α -HLA DR, Becton Dickinson)-positiven T-Lymphozyten von $10,1 \pm 1,5$ % gegenüber $0,9 \pm 0,3$ % der Kontrollgruppe (25). Alviggi et al. (1) fanden 1984 bei 15 Diabetikern innerhalb der ersten 6 Monate nach Diagnosestellung eine mit $9,6 \pm 0,62$ % signifikant höhere Anzahl an L243-positiven Zellen als bei 28 Diabetikern mit mehr als 3-jähriger Erkrankungsdauer ($4,8 \pm 0,45$ %) und einer Kontrollgruppe ($2,2 \pm 0,23$ %). Ilonen (24) berichtete 1984 über eine Vermehrung von OKIa1 (= α -HLA DR)-positiven Zellen bei 63 neu manifesten Typ-I-Diabetikern ($p < 0,01$).

Aufgrund des Polymorphismus der Immunantwortgene und analog dazu der gegen sie gerichteten monoklonalen Antikörper (30,63) hängen die Ergebnisse der Lymphozytentypisierung von der Spezifität der jeweils verwendeten Anti-Ia-Antikörper ab. Neben den Ia-Antigenen werden bei der Aktivierung von T-Lymphozyten auch der Interleukin-2-Rezeptor (Abbildung 1), nachweisbar mit dem TAC-Antikörper (58), und der Transferrinrezeptor, nachweisbar mit den Antikörpern 4F 2 und E 09 (20,19), exprimiert.

Hayard und Herberger (21) beobachteten eine signifikante Erhöhung von TAC-positiven Zellen bei 15 Diabetikern mit einer Erkrankungsdauer unter 2 Jahren im Vergleich zu 6 Diabetikern mit einer Dauer über 3 Jahren und einer Kontrollgruppe. Pozilli et al. (44) untersuchten 16 Diabetiker innerhalb der ersten 3 Jahre nach Diagnosestellung und fanden bei 6 Patienten eine vermehrte Expressierung des Transferrin-Rezeptors.

Zusammenfassend bestätigen die hier erhobenen Befunde, sowie alle Publikationen der letzten Jahre mit verschiedenen Ia-Antikörpern übereinstimmend ein vermehrtes Auftreten aktivierter peripherer T-Lymphozyten und somit die auch bei anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesene Aktivierung der zellulären Immunantwort vor allem in

der klinischen Frühphase der Erkrankung. Sie lassen eine Beteiligung der Ia-Antigen-tragenden Zellen an der Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes vermuten. Diese Vermutung wird gestärkt durch die in prospektiven Familienstudien gemachte Beobachtung, daß bereits vor Manifestation eines Diabetes vermehrt Aktivierungsantigene auf peripheren Blutlymphozyten nachweisbar sind (45, 54). In unserer Klinik konnten bei einem 22-jährigen HLA-DR 3/4 positiven Patienten (Pat Nr. 21, Tabelle 3) mit gelegentlich erhöhten postprandialen Blutzuckerwerten und einer pathologischen oralen Glucosebelastungsreaktion neben Inselzellantikörpern vermehrt K14 und L243 positive Zellen gefunden werden.

4.5. Doppelimmunfluoreszenz von mononukleären Zellen mit Anti-T-Lymphozyten- und Anti-Ia-Antikörpern

Mit dem Verfahren der simultanen Immunfluoreszenz sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welcher Lymphozytensubpopulation die aktivierten, d.h. Immunantwortgen-exprimierenden Zellen angehören. Dazu wurden Vorversuche an aktivierten Lymphozyten eines mit Epstein-Bar-Virus-infizierten Patienten durchgeführt. Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz konnte wiederholt gezeigt werden, daß es sich bei dieser Erkrankung um eine Aktivierung der Suppressor-, bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten handelt, die Ia-Antigene an ihrer Oberfläche exprimieren (Tabelle 2). Ein positiver Nachweis von aktivierten Ia-Antigen-tragenden Helfer- oder Suppressor-T-Lymphozyten bei der Typisierung der peripheren Blutlymphozyten der diabetischen Patienten gelang nicht (Tabelle 3).

Dies spräche dafür, daß es sich bei der Vermehrung der HLA DR-antigen-tragenden Zellen möglicherweise um Makrophagen, Natural-Kill-

ler-Zellen, Monozyten oder B-Lymphozyten handelt. Gegen B-Lymphozyten spricht die fehlende Korrelation der Antikörper K 14 und L243 mit dem B-Zell-markierenden Antikörper Leu 12 (Abbildung 3). Die Ergebnisse von Jackson (25) und Alviggi (1) wurden im Gegensatz zu der hier verwendeten Technik an angereicherten T-Zell-Populationen gewonnen und lassen somit auf eine Aktivierung von T-Lymphozyten schließen, wobei eine Verunreinigung durch Makrophagen und Monozyten nicht ganz auszuschließen ist.

Die hier erhobenen Resultate lassen eher vermuten, daß entweder bei Diabetikern kurz nach Ausbruch der Krankheit eine erhöhte Zahl von Makrophagen und Monozyten vorhanden ist, die die Vermehrung von K 14 und L 243 positiven Zellen erklären. Eine andere Hypothese wäre, daß die aktivierten T-Lymphozyten der diabetischen Patienten das für Helfer- bzw. Suppressor-Zellen spezifische Oberflächenantigen, oder aber die HLA DR-Antigene nur in einer sehr geringen Dichte an ihrer Oberfläche tragen, so daß sie im Gegensatz zu den aktivierten Suppressor-T-Lymphozyten bei Patienten mit infektiöser Mononukleose in der Doppelimmunfluoreszenz nicht erkannt werden können. Eine weitere Hypothese wäre, daß es sich bei den von den Antikörpern K14 und L243 markierten Zellen um Natural-Killer-Zellen (sog. Null-Zellen) handelt, die bekanntlich bei insulinpflichtigen Diabetikern erhöht sein können (35).

Zukünftige Untersuchungen mit neuen Anti-NK, Anti-Makrophagen und Anti-Monozyten-Antikörpern sollte vorbehalten sein, mit dem Verfahren der Doppelimmunfluoreszenz der sehr interessanten Frage der T-Lymphozyten-Aktivierung nachzugehen.

4.6. T-Zell-Subpopulationen

Zur Beurteilung des zellulären Immunsystems wurden bei allen Patienten die Subpopulationen der T-Lymphozyten mit monoclonalen Antikörpern gegen Helfer-(Leu 3), Suppressor-/zytotoxischen Zellen (Leu 2), gesamten T-Zellen (Leu 4) und B-Lymphozyten bestimmt (Tabelle 5, Abbildung 5).

Bei einer insgesamt normalen bis erniedrigten Leukozytenzahl war in der Zeit kurz nach Diagnosestellung (bis 7 Tage) die Lymphozytenzahl signifikant höher (43 %) im Vergleich zu 32 % bei längerer Diabetesdauer ($p < 0.05$) (Abbildung 4). Die Resultate bezüglich Lymphozytensubpopulationen zeigen geringe Schwankungen gegenüber Normalkollektiven. Auffallend ist eine deutlich höhere Standardabweichung bei allen Ergebnissen der Patienten gegenüber dem Kontrollkollektiv. Dies erklärt vielleicht Ergebnisse früherer Untersuchungen (44,47,22,49), die zum Teil erhöhte, zum Teil erniedrigte Zahlen an Helfer- bzw. Suppressor-Zellen ergaben. Letztlich könnte dieser Befund als Hinweis auf eine Dysregulation des Immunsystems gewertet werden, wobei aber auch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Erfassung der Patienten während einer ablaufenden Immunreaktion zu berücksichtigen sind.

4.7. Lymphozyten-Subpopulation bei Diabetikern mit und ohne Inselzellantikörper

Der Nachweis von Inselzellantikörpern, ein Produkt einer stimulierten humoralen Immunantwort, steht nach diesen Ergebnissen in keinem signifikanten direkten Zusammenhang zur nachweisbaren Aktivität bzw. Dysregulation der zellulären Immunantwort. Die Ergeb-

nisse der Lymphozytensubpopulationen und die Zahl der K 14 und L243 positiven Zellen war in der Gruppe der ICA-positiven, wie der ICA-negativen Patienten etwa gleich (Tabelle 7). Diese Beobachtung entspricht der von Pozzilli (45), der keine signifikante Koinzidenz von positiven Inselzellantikörpern und aktivierten T-Zellen in seiner prospektiven Familienstudie gesehen hat. Es spricht dafür, daß die beiden Immunsysteme zu verschiedenen Zeitpunkten aktiviert sein können und daß ein fehlender Nachweis von Inselzellantikörpern eine Folgerung auf die Aktivität der zellulären Immunantwort nicht zuläßt.

5. Zusammenfassung

Zur Erforschung zellulärer Immunphänomene bei der Manifestation eines Diabetes mellitus und ihrer Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung wurden immunkompetente periphere Blutlymphozyten bei 20 insulinpflichtigen Diabetikern im Alter zwischen 12 - 40 Jahren (davon 10 mit einer Diabetesdauer unter einer Woche, 10 mit einer Diabetesdauer bis zu 8 Monaten) untersucht.

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Lymphozyten aus dem peripheren Blut präpariert und mit monoklonalen Anti-T-Lymphozyten (Leu2, 3, 4, 12) und Anti-HLA DR-Antikörpern (K14, L243) mittels indirekter Immunfluoreszenz charakterisiert.

Alle Patienten mit neu manifestiertem insulinpflichtigem Diabetes zeigten eine signifikante Vermehrung von K14 ($14 \pm 5 \%$) und L243 ($24 \pm 9 \%$)-positiven Zellen verglichen mit einer Gruppe gesunder Normalpersonen (K14: $5 \pm 2 \%$, $p < 0,001$; L243: $11 \pm 6 \%$, $p < 0,002$).

Außerdem ließ sich für den Antikörper K 14 eine Abnahme der positiven Zellen mit zunehmender Diabetesdauer beobachten (Diabetesdauer unter 7 Tg: K14: $16 \pm 5 \%$. Diabetesdauer bis 8 Monate: $11 \pm 4 \%$. $p < 0,05$).

Eine Bestätigung der in bisherigen Publikationen aufgestellten These, daß es sich bei diesen Ia-Antigen exprimierenden Zellen um eine Aktivierung der T-Lymphozyten handelt, konnte durch das Verfahren der Doppelimmunfluoreszenz an mononukleären Zellen mit Fluorescein-konjugierten Anti-T-Lymphozyten- und

Rhodamin-konjugierten Anti-Ia-Antikörpern nicht erbracht werden. Das vermehrte Auftreten von Aktivierungsantigenen zu Beginn der Erkrankung eines Diabetes mellitus könnte somit auch durch eine Vermehrung von Makrophagen und Monozyten erklärt werden.

Bei einer insgesamt normalen Leukozytenzahl war bei Patienten mit kurzer Diabetesdauer der Prozentsatz an Lymphozyten im Verhältnis zu Leukozyten signifikant höher ($43 \pm 3 \%$) als bei Patienten mit längerer Diabetesdauer ($32 \pm 4 \%$) ($p < 0,05$).

Wesentliche Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen (Helfer- und Suppressor-T-Lymphozyten) im Vergleich zu Kontrollkollektive lagen nicht vor.

Auch eine Korrelation zwischen dem Nachweis humoraler Immunphänomene wie Inselzellantikörper und Veränderungen der zellulären Abwehr konnten nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bestätigen die Befunde eine vermehrte HLA DR-Antigen-Exprimierung auf peripheren mononukleären Zellen und somit eine Aktivierung der zellulären Immunantwort vor allem in der Frühphase der Erkrankung. Sie lassen eine Beteiligung der Ia-Antigen tragenden Zellen an der Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes vermuten.

6. Literaturverzeichnis

1. Alviggi, L., Hoskins, P.J., Pyke, P.A., Johnston, C., Tee, D.E.H., Leslie, R.D.G.: Pathogenesis of insulin-dependent diabetes: a role for activated T-lymphocytes.
Lancet (1984) 7: 4
2. Benacerraf, B., Katz, D.H.: Histocompatibility-linked immune response genes.
Adr. Cancer Res. (1975) 21: 121
3. Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D.: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.
Lancet (1974) 2: 1279
4. Bottazzo, G.F., Dean, B.M., McNally, J.M., MacKay, E.H., Swift, P.G.F., Gamble, D.R.: In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA-molecules in the pancreas in diabetes insulin.
New Engl. J. Med. (1985) 313: 353
5. Bottazzo, G.F., Pujol-Borrele, R., Hanafusa, T.: Role of aberrant HLA DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity.
Lancet (1983) 12: 1115

6. Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1968) 97: 21
7. Burmester, G.R., Yu, D.T.Y., Ivani, A.M., Kunkel, H.G., Winchester, R.I.: IA + T-cells in synovial fluid and tissues of patients with rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. (1981) 24: 1370
8. Buschard, Röpke, C., Madsbad, S., Mehlsen, J., Ruygaard, J.: Lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed type I diabetes: a prospective study.
Diabetes (1983) 25: 247
9. Cammidge, P.J.: Diabetes mellitus and heredity.
Brit. Med. J. (1928) 2: 738
10. Christy, M., Deckert, T., Nerup, I.: Immunity and autoimmunity in diabetes mellitus.
Clin. Endocr. Metab. (1977) 6: 305
11. Cudworth, A.G., Woodrow, J.C.: HLA-antigens and diabetes mellitus.
Lancet (1974) 2: 1153

12. Eisenbarth, G.S.: Autoimmune beta cell insufficiency-diabetes mellitus type I.
Triangle (1984) 23: 111
13. Finkelstein, S., Zeller, E., Walford, R.L.: No relation between HLA- and juvenile diabetes.
Tissue antigens (1972) 2: 74
14. Foulis, A.K., Stewart, J.A.: The pancreas in recent-onset type I diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue.
Diabetologia (1984) 26: 456
15. Galluzzo, A., Giordano, C., Rubino, G., Bompiani, G.P.: Immunoregulatory T-lymphocyte subset deficiency in newly diagnosed type I diabetes mellitus.
Diabetologia (1984) 26: 426
16. Gepts, W., Toussaint, D.: Spontaneous diabetes in dogs and cats. A pathological study. Diabetologia (1967) 3: 249
17. Gepts, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.
Diabetes (1965) 14, 619

18. Goldmann, S.F.: Das Haupt-Histokompatibilitätssystem HLA und die Genetik der Zuckerkrankheit.
Dtsch. Ärztebl. (1982) 79, 17, 45
19. Haynes, B.F., Hemler, M., Cotner, t., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S. et al.: Characterisation of a monoclonal antibody (5E9) that defines a human cell surface antigen of cell activation.
Immunology (1981) 127, 347
20. Haynes, B.F., Hemler, M.E., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S. et al.: Characterisation of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes.
Immunology (1981) 126: 1409
21. Hayward, A., Herberger, M.: Culture and phenotype of activated T-cells from patients with type I diabetes mellitus.
Diabetes (1984) 33: 319
22. Herold, K.C., Huen, A., Gould, L., Traisman, H., Rubenstein, A.H.: Alterations in lymphocyte subpopulations in type I diabetes mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena.
Diabetologia (1984) 27: 102

23. Huang, S.-W., MacLaren, N.K.: Insulin-dependent diabetes: a disease of autoaggression. *Science* (1976) 192: 64
24. Ilonen, J., Surcel, H.M., Mustonen, A., Käär, M.L., Åkerblom, H.K.: Lymphocyte subpopulations at the onset of type I diabetes. *Diabetologia* (1984) 27: 106
25. Jackson, R., Morris, M.A., Haynes, B.F., Eisenbarth, G.S.: Increased circulating Ia-antigen-bearring T-cells in type I diabetes mellitus. *New. Engl. J. Med.* (1982) 306: 783
26. Jackson, B., Browning, M., Morris, M., Haynes, B., Eisenbarth, G.: Increased circulating IA positive T-cells in recent onset graves' disease and insulin dependent diabetes. Presented at the 63d annual meeting of the Endoc. Society, Cincinnati, Ohio, 1981
27. Johnson, H.E., Madsen, M., Kristensen, T., Kissmeyer-Nielsen, F.: Expression of HLA-DR determinants on human T-cells in infectious mononucleosis. *Scand. J. Immunol.* (1978) 8, 160 (abstract)

28. Ko, H.S., Fu, S.M., Winchester, R.J., Yu, D.T.Y., Kunkel, H.G.:
IA-determinants on stimulated human T-lymphocytes: occurrence
on mitogen- and antigen-activated T-cells.
J. Exp. Med. (1979) 150: 245
28. Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells
secreting antibodies of predefined specificity.
Nature (1975) 256: 495
30. Lampson, L., Levy, R.: Two populations of IA-like molecules
on a human B-cell line.
Immunology (1980) 125: 293
31. Lernmark, A.: Molecular biology of type I diabetes mellitus.
Diabetologia (1985) 28: 195
32. Lernmark, A., Rheedman, Z.R., Hofmann, G., Rubenstein, A.M.,
Steiner, D.F., Jackson, R.L., Winter, R.J., Traisman, H.S.:
Islet cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus.
New Engl. J. Med. (1978) 299: 375
33. Lernmark, A., Hägglof, B., Freedman, Z., Irvine, J., Lud-
vigsson, J., Holmgren, G.: A prospective analysis of anti-
bodies reacting with pancreatic islet cells in insulin de-
pendent diabetic children.
Diabetologia (1981) 20: 471

34. Like, A.A., Rossini, A.A., Guberski, D.L., Appel, M.C., Williams, R.M.: Spontaneous diabetes mellitus: reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes.
Science (1979) 206: 1421
35. Like, A.A., Rossini, A.A.: Streptozotocin-induced pancreatic insulins. A new model of diabetes mellitus.
Science (1976) 193: 415
36. MacCuish, A.C., Jordan, J., Campbell, C.J., Duncan, L.J.P., Irvine, W.J.: Cell mediated immunity to human pancreas in diabetes mellitus.
Diabetes (1974) 23: 693
- 36b. Makino, S., Kunimoto, K., Muraoko, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y.: Breeding of a non obese diabetes strain of mice.
Exp. Anim. (1980) 29: 1
37. Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M., Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T-cells bearing receptors for IgM or IgG.
J. Exp. Med. (1977) 146: 184

38. Nakhlooda, A.F., Like, A.A., Chappel, C.I., Wei, C.N., Mar-
lis, E.B.: The spontaneously diabetic wistar rat.
Diabetologia (1978) 14: 199
39. Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J., Poul-
sen, J.E.: Antipancreatic cellular hypersensitivity in dia-
betes mellitus.
Diabetes (1971) 20: 424
40. Nerup, J., Ortred Andersen, O., Bendixen G., Egeberg, J.,
Gunnarsson, R., Kromann, H., Poulsen, J.E.: Cell mediated
immunity in diabetes mellitus.
Proc. Roy. Soc. Med. (1974) 67: 506
41. Nussenblatt, R.B., Cevario, S.J., Gery, J.:

Lancet (1980), 2: 722
42. Pincus, G., White, P.: On the inheritance of diabetes melli-
tus.
Am. J. med. Science (1933) I: 186
43. Platz, P., Jakobsen, B.K., Morling, N., Nerup, J. et al.:
HLA-D- and -DR-Antigens in genetic analysis of insulin de-
pendent diabetes mellitus.
Diabetologia (1981) 21: 108

44. Pozzilli, O., Zuccarini, M., Lavicoli, M., Andreani, D., Spencer, K.M., Bottazzo, G.F., Cudworth, G.: Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type I diabetes.
Diabetes (1983) 32: 91
45. Pozzilli, P., Sensi, M., Al-Sakkaj, L., Taru, A., Zuccarini, O., Bottazzo, G.F.: Prospective study of lymphocyte subsets in subjects genetically susceptible to type I diabetes.
Diabetologia (1984) 27: 132
46. Pujol-Borrell, R., Khovry, E.L., Bottazzo, G.F.: Islet cell surface antibodies in type I diabetes mellitus: use of human fetal pancreas cultures as substrate.
Diabetologia (1982) 22: 89
47. Quinque-Debrie, M., Debray-Sachs, M., Dardenne, M., Czerui-chow, P., Assan, R., Bach, J.F.: Anti-islet cellular and humoral immunity, T-cell subsets, and thymic function in type I diabetes.
Diabetes (1985) 34: 373
48. Richman, D.P., Patrick, J., Arnason, B.G.W.
New Engl. J. Med. (1976) 294: 694

49. Rodier, M., Audary, M., Richard, J.L., Mirouze, J., Clot, J.:
Peripheral blood T-cell subsets studied by monoclonal anti-
bodies in type I diabetes: effect of blood glucose control
Diabetologia (1984) 27: 136

50. Schöffling, K., Mehnert, H.: Klassifikation, Ätiologie, Pa-
thogenese, Epidemiologie, Verlauf und Prognose.
Diabetologie in Klinik und Praxis (1984) 2: 33

51. Schricker, M.: Herstellung monoklonaler Antikörper gegen
frühe Differenzierungsantigene auf Leukozyten.
Inaugur. Dissertation, München, 1983

52. Skreftler, D.C., David, Ch.S.: The H-2 major histocompati-
bility complex and the I immune response region: genetic
variation, function and organization.
Adr. Immunol. (1975) 21: 125

53. Singal, D.P., Blaichman, M.A.: Histocompatibility (HL-A) an-
tigens lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies
in patients with diabetes mellitus.
Diabetes (1973) 22: 429-432

54. Skrikanta, S., Ganden, O.P., Gleason, R.E., Jackson, R.A.,
Soeldner, J.S., Eisenbarth, G.S.: Pre-type I diabetes.
Diabetes (1984) 33: 717

55. Skrikanta, S., Ganda, P., Eisenbarth, G., Soeldner, J.:
Islet cell antibodies and beta-cell function in monozygotic
triplets and twins initially discordant for type I diabe-
tes mellitus.
New Engl. J. Med. (1983) 308: 322
56. Tattersall, R.B., Pyke, D.A.: Diabetes in identical twins.
Lancet (1972) 2: 1120
57. Then Berg, H.: The genetic aspect of diabetes mellitus.
J. Amer. med. Ass. (1939) 112: 1091
58. Uchiyama, T., Broder, S., Waldmann, Th.: A monoclonal anti-
body (anti-TAC) reactive with activated and functionally
mature human T-cells.
Immunology (1981) 126: 1393
59. Volpe, R.: Immunological aspects of thyroid disease.
Triangle (1984) 23: 95
60. White, P.: The inheritance of diabetes.
Med. Clin. N. Amer. (1965) 49: 857
61. Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Statistik,
8. Auflage, Basel 1980

62. Wolf, E., Spencer, K.M., Cutworth, A.G.: The genetic susceptibility to type I diabetes: analysis of the HLA-DR association. Diabetologia (1983) 24: 224
63. Yokoi, T., Miyawaki, T., Yachi, A. et al.: Discrepancy in expression ability of TAC antigen and IA-determinants defined by monoclonal antibodies on activated or cultured cord blood T-lymphocytes. Immunology (1982) 129: 1441
64. Yu, D.T.Y., Winchester, R.J., Fu, S.M., Gibofsky, A., Ko, H.S.: Peripheral blood Ia-positive T-cells. J. Exp. Med. (1980) 151: 91

LEBENS LAUF

Anette-Gabriele Ziegler

13.06.1958	geboren in München Eltern: Albert und Edelgard Ziegler
1964 - 1968	Besuch der Grundschule in München
1968 - 1977	Besuch des Ludwigs-Gymnasiums, München
24.06.1977	Reifeprüfung
1977 - 1978	Studienaufenthalt in Paris
1978 - 1984	Studium der Humanmedizin und der Philosophie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
18.03.1980	Ärztliche Vorprüfung
26.03.1981	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
18.03.1983	2. Teil der Ärztlichen Prüfung
15.05.1984	3. Teil der Ärztlichen Prüfung
15.05.1984	Approbation als Arzt
seit 15.08.1984	Assistenzarzt der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Standl für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Th. Lander für die freundliche und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Kolb danke ich für die Bestimmung der Inselzellantikörper, Herrn Prof. Dr. E. Albert für die HLA-Typisierung und ganz besonders Herrn Prof. Dr. E.P. Rieber für die Überlassung des Antikörpers K 14.

Herrn Prof. Dr. H. Mehnert danke ich für sein Entgegenkommen, in seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

